

HIV-TYPE VIRAL ACTIVITY INHIBITOR

Patent number: JP7173070
Publication date: 1995-07-11
Inventor: NAGAOKA HITOSHI
Applicant: HITOSHI NAGAOKA
Classification:
- international: A61K35/84
- european:
Application number: JP19930317564 19931217
Priority number(s):

Abstract of JP7173070

PURPOSE:To obtain an inhibitor inhibiting the activity of HIV-type virus, thus capable of suppressing the proliferation of this type virus, also with little concern for side effects and high in safety.

CONSTITUTION:A solid medium with bagasse as the base is inoculated with Cortinellus shiitake, which are then proliferated; the solid medium containing the resultant mycelia is disaggregated, and water and at least one kind of enzyme selected from cellulase and protease are added to the disaggregated solid medium while keeping its temp. at 30-50 deg.C and the medium is then ground/ crushed in the presence of the enzyme followed by extracting a mycelial extract of Cortinellus shiitake from the solid medium, and this extract is heated to a temperature of <=95 deg.C to deactivate and sterilize the enzyme. This HIV-type viral activity inhibitor is characterized by containing the extract obtained above.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-173070

(43)公開日 平成7年(1995)7月11日

(51)Int.Cl.⁹
A 6 1 K 35/84

識別記号 庁内整理番号
A D Y A 8217-4C

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平5-317564

(22)出願日 平成5年(1993)12月17日

(71)出願人 390041243

長岡 均

千葉県我孫子市寿2丁目22番13号

(72)発明者 長岡 均

千葉県我孫子市寿2丁目22番13号

(74)代理人 弁理士 鈴木 俊一郎

(54)【発明の名称】 H I V型ウイルス活性阻害剤

(57)【要約】

【構成】バカスを基材とする固体培地上に、椎茸菌を接種し、次いで菌糸体を増殖して得られる菌糸体を含む固体培地を解凍し、この解凍された固体培地に、水およびセルラーゼまたはプロテアーゼから選ばれる酵素の1種またはそれ以上を、前記固体培地を30～50℃以上に保ちながら添加し、そして前記固体培地を酵素の存在下に粉碎およびらい漬して椎茸菌糸体エキスを抽出し、次いで95℃までの温度に加熱することにより酵素を失活させかつ滅菌してなる椎茸菌糸体エキスを含有することを特徴とするH I V型ウイルス活性阻害剤。

【効果】このH I V型ウイルス活性阻害剤は、H I V型ウイルスの活性を阻害し、該ウイルスの増殖を抑制することができ、しかも副作用の虞が少なく安全性に優れている。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 バカスを基材とする固体培地上に、椎茸菌を接種し、次いで菌糸体を増殖して得られる菌糸体を含む固体培地を解凍し、この解凍された固体培地に、水およびセルラーゼまたはプロテアーゼから選ばれる酵素の1種またはそれ以上を、前記固体培地を30～50℃以上に保ちながら添加し、そして前記固体培地を酵素の存在下に粉碎およびらい潰して椎茸菌糸体エキスを抽出し、次いで95℃までの温度に加熱することにより酵素を失活させかつ滅菌してなる椎茸菌糸体エキスを含有する

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の技術分野】本発明は、HIV型ウイルス活性阻害剤に関し、さらに詳しくはHIV型ウイルス感染症の治療に有効であり副作用の少ないようなHIV型ウイルス活性阻害剤に関する。

【0002】

【従来技術】1950年にアフリカで発見されたHIV型ウイルス感染による死亡例が世界で最初と報告されているが、HIV型ウイルス感染者は瞬く間に全世界に広まり近年では、HIV型ウイルスに感染し、死亡する例が多数報告されている。

【0003】このようなHIV型ウイルス感染者に対する治療薬としては、AZT、ddI、ddC、interleukin-1I、GL0223、DHCA、 γ -beta-ser Interferon、alpha interferon、gamma interferon等が挙げられる。

【0004】しかしながら、これらの治療薬には、副作用が強い、あるいは効果が乏しいなどの問題点があり、未だ決め手となるようなHIV型ウイルス活性阻害剤は見出されていない。

【0005】このため、本発明者らは、HIV型ウイルス活性を阻害し、該ウイルスを死滅させることができ、副作用の虞がないようなHIV型ウイルス活性阻害剤を開発すべく鋭意研究したところ、特定の方法にて製造される特定の菌糸体エキ스가HIV型ウイルス活性を阻害し、HIV型ウイルスの増殖を抑えることなどを見い出し、本発明を完成するに至った。

【0006】なお、特公昭60-23826号公報には、「バカスを基材とする固体培地上に椎茸菌を接種し、次いで菌糸体を増殖して得られる菌糸体を含む固体培地を、12メッシュ通過分が30重量%以下となるように解凍し、この解凍された固体培地に、水およびセルラーゼまたはプロテアーゼから選ばれる酵素の1種またはそれ以上を、前記固体培地を30～50℃以上に保ちながら添加し、そして前記固体培地を酵素の存在下に粉碎およびらい潰してバカス繊維の少なくとも70重量%以上が12メッシュ通過分であるようにし、次いで95℃までの温度に加熱することにより酵素を失活させかつ

滅菌するとともに、得られた懸濁状液を濾過することを特徴とする保健飲料の製造方法」が記載されている。

【0007】さらにまた特願昭59-5355号（特公平4-35149号公報）、特願昭59-5356号（特公平4-6171号公報）には、靈芝菌を用いた保健飲料の製造方法が記載されている。

【0008】しかしながら、これら公報には、得られた保健飲料が、HIV型ウイルス活性に対する阻害剤として有効であることなど記載も示唆もされていない。なお、椎茸由来の生理活性物質に関する文献は、数点発表されている。

【0009】田口鐵男らのBIO THERAPY; 2巻3号 p.509-521(昭和63年6月)によると、椎茸由来のレンチナンがHIV治療薬AZTとの併用により、HIVの増殖を抑制すると述べられている。また、上記論文の共著者である千原呉郎は、薬学雑誌; 108(3)p.171-186(1988)において、その主たる物質は、 β -1,6; β -1,3-D-glucanであると発表している。

【0010】また、Harumi Suzukiらは、BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS; 160(1)p.367-337(1988)において、椎茸菌糸体抽出物(LEM)には、抗HIV活性があると述べている。また、その主たる物質は、Agri. Biol. Chem.; 54(2)p.479-487(1990)において、LEM中の水溶性リグニンであると記載されている。

【0011】ところで、本発明におけるHIV型ウイルス活性阻害剤は、in vitroにおいて未精製物質でも125 μ g/mlで十分な活性阻害を示し上記の既発表物質とは異なる。

【0012】

【発明の目的】本発明は、上記のような従来技術に伴う問題点を解決しようとするものであって、HIV型ウイルスの活性を阻害し、該ウイルスの増殖を抑制することができ、しかも副作用の虞が少なく安全性に優れたHIV型ウイルス活性阻害剤を提供することを目的としている。

【0013】

【発明の概要】本発明に係るHIV型ウイルス活性阻害剤は、バカスを基材とする固体培地上に椎茸菌を接種し、次いで菌糸体を増殖して得られる菌糸体を含む固体培地を解凍し、この解凍された固体培地に、水およびセルラーゼまたはプロテアーゼから選ばれる酵素の1種またはそれ以上を、前記固体培地を30～50℃以上に保ちながら添加し、そして前記固体培地を酵素の存在下に粉碎およびらい潰して椎茸菌糸体エキスを抽出し、次いで95℃までの温度に加熱することにより酵素を失活させかつ滅菌してなる椎茸菌糸体エキスを含有することを特徴としている。

【0014】このような方法にて得られる椎茸菌糸体エキスを含有するHIV型ウイルス活性阻害剤は、HIV型

ウイルスの活性を阻害し、該ウイルスの増殖を抑制することができ、しかも副作用の虞が少なく安全性に優れている。

【0015】

【発明の具体的説明】以下、本発明に係るHIV型ウイルス活性阻害剤について具体的に説明する。

【HIV型ウイルス活性阻害剤の製造】本発明に係るHIV型ウイルス活性阻害剤には、担子菌類の椎茸菌糸体エキス、靈芝菌糸体エキスあるいはえのき茸菌糸体エキスの1種またはそれ以上の担子菌類菌糸体エキスが含まれている。

【0016】椎茸菌糸体エキスは、特公昭60-23826号公報に記載された方法を利用して調製することができ、靈芝菌糸体エキスは、特願昭59-5355号（特公平4-35149号公報）、特願昭59-5356号（特公平4-6171号公報）などに記載された方法を利用して調製することができる。

【0017】椎茸菌糸体エキスを調製するには、具体的には、まずバカスからなる固体培地に水、好ましくは純水を適度に混ぜた後、椎茸菌を接種する。なお、このバカス培地に、米糠の他、必要によりリン、鉄、ゲルマニウム等のミネラル類、落花生表皮、玄米などを添加してもよい。

【0018】次いで、このように椎茸菌が接種された培地を、温度および湿度が調節されさらには照度も調節された培養室内に入れて、菌糸体を増殖させる。菌糸体が固体培地に蔓延し、子実体の発生直前・直後の時期に、バカス基材の繊維素を解束し、12メッシュ通過分が30重量%以下となるようにすることが望ましい。なお、バカス基材培地の解束は、上記のように子実体の発生直前・直後の時期に行うことが好ましいが、子実体がかかなり成長した後の時期に行ってもよい。

【0019】このように解束された固体培地に、水およびセルラーゼ、プロテアーゼまたはグルコシダーゼから選ばれる酵素の1種またはそれ以上を、固体培地を30～50℃に保ちながら添加する。添加される酵素としては、セルラーゼが好ましい。酵素の添加量は、固体培地1kgに対して0.5～5g好ましくは1～3gであることが好ましい。また水は、金属イオン等のイオン類を含まない純水が好ましく、この解束された培地1kgに対して、純水1～10kg好ましくは2～6kgを加えてバカス含有混合物とする。

【0020】次いでこのバカス含有混合物から椎茸菌糸体エキスを抽出するが、このように椎茸菌糸体エキスを抽出するには、培地含有混合物を、例えば変速機付ギヤーポンプ等を用いて循環させながら、固体培地に粉碎およびらい漬作用を加えてバカス繊維の約70重量%以上が12メッシュ通過分となるようにすることが望ましい。

【0021】バカス含有混合物の粉碎およびらい漬は、

該混合物の温度を30～50℃に保ちながら行ってもよく、温度を上記温度より徐々に上昇させながら行ってもよいが、温度を上昇させながら行うことが好ましい。水温が60℃以上好ましくは70℃以上となったときに、バカス含有混合物中に室温の空気を噴入をさせると、空気泡は急激に加熱されて破壊し、バカス繊維に衝撃を与え有効成分の抽出をより効率的に行うことができる。

【0022】次いで、このようにして処理されたバカス含有混合物をさらに加熱して95℃までの温度、好ましくは75～90℃程度の温度に加熱し、この温度で数十分間保持して該混合物中の酵素を失活させるとともに、該混合物を殺菌すると、椎茸菌糸体エキスが得られる。

【0023】なお、得られた椎茸菌糸体エキスを必要に応じて、50～120メッシュ好ましくは60～100メッシュ程度の濾布を用いて濾過してもよい。このようにして得られる椎茸菌糸体エキスは、濃縮して用いることもでき、また凍結乾燥して粉末状として用いることもできる。

【0024】本発明のHIV型ウイルス活性阻害剤には、上記菌糸体エキスは、通常1～3重量%程度の量で含まれている。このようなHIV型ウイルス活性阻害剤は、顆粒状、液状、錠剤、カプセル状など各種剤形にて経口投与してもよく、また注射液としてHIV型ウイルス感染者に投与してもよい。また、上記の菌糸体エキス原液が含まれたHIV型ウイルス活性阻害剤は、希釈せずにそのままHIV型ウイルス感染者に投与することもできるが、例えば精製水、アルコール等で適宜希釈して投与することもできる。

【0025】上記のように、本発明に係る椎茸菌糸体エキスからなるHIV型ウイルス活性阻害剤をHIV型ウイルス感染者に投与すると、HIV型ウイルスの活性を著しく弱め、その増殖を抑制することができ、またHIV型ウイルスに感染し弱った細胞を蘇生させ長期間生存させることができる。

【0026】このように本発明に係る椎茸菌糸体エキスからなるHIV型ウイルス活性阻害剤を投与するとHIV型ウイルス活性を弱め、あるいはその増殖を抑制し、HIV型ウイルスに感染したヒトの細胞を活性化させることができるのは、次のような理由によるのであろうと思われる。

【0027】すなわち、この椎茸菌糸体エキスからなるHIV型ウイルス活性阻害剤には、本発明者らの研究によれば、椎茸菌糸体から抽出される有効成分と、椎茸菌糸体が培養された固体培地とから抽出される有効成分とが多数混在し、これらの成分（未同定である）がHIVウイルスの阻害活性を有するのであろうと考えられる。

【0028】このことは、椎茸菌糸体のみから抽出される有効成分は、HIVウイルスに対してほとんど阻害活性を示さず、また固体培地（バカス）のみから抽出される有効成分は、HIVウイルスに対してほとんど阻害活

性を示さないことから推定される。

【0029】

【発明の効果】本発明によれば、HIV型ウイルスの活性を阻害し、あるいは該ウイルスの増殖を抑制することができ、しかも、HIV型ウイルスに感染したヒトの細胞の活性を促進することができ、副作用の虞がなく安全性に優れたHIV型ウイルス活性阻害剤が提供される。

【0030】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何等制限されるものではない。

【0031】

【調製例1】

【椎茸菌糸体エキスからなるHIV型ウイルス活性阻害剤の調製】バカス90重量部、米糠10重量部からなる固体培地に純水を適度に含ませた後に、椎茸種菌を接種し、温度および湿度を調節した培養室内に置き、菌糸体を増殖させた。菌糸体が固体培地に蔓延した後、バカス基材の繊維素を解束し、12メッシュ通過分が24重量%以下になるようにした。この解束された培地1.0kgに、純水3.5リットルおよび精製セルラーゼ2.0gを固体培地を40℃に保ちながら加えてバカス含有混合物とした。

【0032】次いで培地含有混合物を变速機付ギヤーポンプにより循環させながら、固体培地に該ポンプのギヤー部分において粉碎およびらい潰作用を200分間程度加え、バカス繊維の約80重量%が12メッシュ通過分となるようにした。バカス含有混合物の粉碎およびらい潰は、該混合物の温度を徐々に上昇させながら行った。

【0033】その後、バカス含有混合物をさらに加熱して、90℃として30分間放置した。90℃への加熱により酵素を失活させ、かつ殺菌を施した。

【0034】得られた培地含有混合物を60メッシュ濾布を用いて濾過し、微小浮遊物を含有する椎茸菌糸体エキスを得た。

【0035】

【試験例1〜10】上記調製例1で得られた椎茸菌糸体エキスからなるHIV型ウイルス活性阻害剤について、Antiviral Research, 20(1993)317-331に準じて抗HIVウイルス活性を測定した。

【0036】すなわち、ヒトヘルパーT細胞が成人T細胞白血病ウイルスにて型質転換されてなるヒトT4リン

パ細胞MT-4を標的細胞として用い、このMT-4細胞(10^4 /ml)にHIVウイルス(HIV 1型RF株, 2×10^3 TCD₅₀/ml)を37℃で、1時間感染させた。

【0037】次いで、このようにHIV型ウイルスの感染処理を行ったMT-4細胞(感染多重度: 0.02)を新鮮培地で洗浄し、未吸着ウイルスを除去したのち、その細胞数を 5×10^4 個/mlに調整し、96穴マイクロプレートの各窪み(ウェル)に100μlずつ分注した。

【0038】次いで、このようにHIV型ウイルス感染MT-4細胞が分注されているマイクロプレートの各窪みに、最終濃度の2倍濃度のHIV型ウイルス活性阻害剤が溶解されている培地100μlをそれぞれ加えて、37℃で5〜6日間培養を行なった。

【0039】培養最終日に、MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]を上記マイクロプレートの各窪みに加えて、さらに4時間培養を行ったのち、生成するフォルマザン色素の濃度を、595nmにおける吸光度(Absorbance)を測定することにより比色定量した。

【0040】結果を表1に示す。なお、表1には、HIVウイルスに感染していない標的細胞MT-4に、調製例1に示したHIV型ウイルス活性阻害剤を上記と同様に加えた場合のフォルマザン色素濃度(吸光度)も併せて示す。

【0041】なお、表1に示す活性表示(%)は、以下のようにして求めた。すなわち、標的細胞MT-4を含む培地100μlにHIV型ウイルス活性阻害剤濃度0の培地100μlを加えて、標的細胞MT-4を培養した後の色素濃度を595nmで比色測定し、この吸光度(Absorbance)を100とした(試験番号1)。一方、上記のように各種濃度のHIV型ウイルス活性阻害剤を用いた場合における吸光度を測定し、その比を百分率(%)にて示し、活性表示(生存率表示)とした。例えば、試験例2の吸光度は、1.122であり、試験例1の吸光度は、1.056であるから、試験例2の細胞生存率(%) = $1.122 / 1.056 \approx 106.3\%$ となる。

【0042】

【表1】

試験番号	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	MT-4		MT-4/HIV	
		吸光度	生存率 (%)	吸光度	生存率 (%)
1	Control :	1.056	100.0	0.089	8.4
2	3.9063	1.122	106.3	0.174	16.5
3	7.8125	1.207	114.3	0.175	16.6
4	15.6250	1.191	112.8	0.310	28.4
5	31.2500	1.186	113.3	0.304	28.8
6	62.5000	1.182	112.9	0.515	48.8
7	125.0000	0.991	98.8	0.755	71.5
8	250.0000	0.105	9.9	0.155	14.7
9	500.0000	0.034	3.2	0.082	3.0
10	1000.0000	0.040	3.8	0.046	4.4

【0043】図1は、この表1の結果をグラフにしたものである。この表1または図1によれば、MT-4細胞は、HIV型ウイルス活性阻害剤濃度が $125\mu\text{g/ml}$ を超えるとHIVウイルス処理しなくとも、HIV型ウイルス活性阻害剤由来の影響を受けてその生存率が下がるが、それ以下の濃度範囲では、HIV型ウイルス活性阻害剤の濃度が高くなるにつれて、HIV型ウイルス活性阻害剤の持つ抗エイズウイルス活性により、HIVウイルスに感染したMT-4細胞の生存率が上がっていることが解る。特に、HIV型ウイルス活性阻害剤濃度が $125\mu\text{g/ml}$ の場合には、HIV型ウイルスに感染したMT-4細胞の生存率は71.5%になっている。

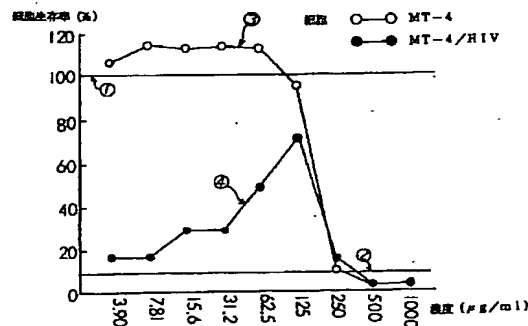
【図面の簡単な説明】

*【図1】図1は、表1の結果をグラフにしたものである。

【符号の説明】

①は、HIV型ウイルス活性阻害剤による処理を行わなかったMT-4細胞の細胞生存率（100%）を示す。
②は、HIV型ウイルスに感染させたMT-4細胞に、 $3.9063\sim 1000.0000\mu\text{g/ml}$ の濃度のHIV型ウイルス活性阻害剤による処理を行わなかった場合の細胞生存率を示す。
③は、MT-4細胞に上記の濃度でHIV型ウイルス活性阻害剤による処理を行った場合の細胞生存率を示す（○印）。
④は、HIV型ウイルスに感染させたMT-4細胞に、上記の濃度でHIV型ウイルス活性阻害剤による処理を行った場合の細胞生存率を示す（●印）。

【図1】



【手続補正書】

【提出日】平成6年1月11日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正内容】

【0024】本発明のHIV型ウイルス活性阻害剤は、上記菌糸体エキ스는、通常1～3重量%程度の量で*

*含まれている。このようなHIV型ウイルス活性阻害剤は、顆粒状、液状、錠剤、カプセル状など各種剤形にて経口投与してもよく、またHIV型ウイルス感染者に使用する注射液としての開発も可能である。また、上記の菌糸体エキス原液が含まれたHIV型ウイルス活性阻害剤は、希釈せずにそのままHIV型ウイルス感染者に投与することもできるが、例えば精製水、アルコール等で適宜希釈して投与することもできる。

【手続補正書】

【提出日】平成6年12月19日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正内容】

【0024】本発明のHIV型ウイルス活性阻害剤は、上記菌糸体エキ스는、通常1～3重量%程度の量で

含まれている。このようなHIV型ウイルス活性阻害剤は、顆粒状、液状、錠剤、カプセル状など各種剤形にて経口投与してもよく、またHIV型ウイルス感染者に使用する注射液としての開発も可能である。また、上記の菌糸体エキス原液が含まれたHIV型ウイルス活性阻害剤は、希釈せずにそのままHIV型ウイルス感染者に投与することもできるが、例えば精製水、アルコール等で適宜希釈して投与することもできる。